

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日 2005年 6月 7日  
Date of Application:

出願番号 特願2005-166754  
Application Number:

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

The country code and number  
of your priority application,  
if any, used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

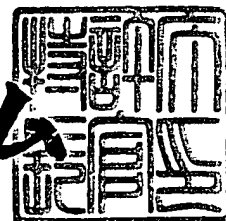
J P 2 0 0 5 - 1 6 6 7 5 4

願 人 キヤノン株式会社  
Applicant(s):

2010年 3月12日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

細野 哲弘





【書類名】 特許願  
【整理番号】 0019076-01  
【提出日】 平成17年 6月 7日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C01B 33/12  
B01J 19/00

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キャノン株式会社内  
【氏名】 村田 雄輔

【特許出願人】  
【識別番号】 000001007  
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号  
【氏名又は名称】 キャノン株式会社  
【代表者】 御手洗 富士夫

【代理人】  
【識別番号】 100090538  
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キャノン株式会社内  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 西山 恵三  
【電話番号】 03-3758-2111

【選任した代理人】  
【識別番号】 100096965  
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キャノン株式会社内  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 内尾 裕一  
【電話番号】 03-3758-2111

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 011224  
【納付金額】 16,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 9908388

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

枝分かれしたロッド状の形態を有する構成単位から形成される多孔質材料であって、前記ロッドの短軸方向に配向したチューブ状のメソ孔と、枝分かれしたロッド状構成単位が三次元的に網目状に配列することで、ロッド間に形成されるマクロ細孔とを併せ持つことを特徴とする多孔質材料。

**【請求項 2】**

前記チューブ状メソ細孔がハニカム状にパッキングした構造を有することを特徴とする請求項 1 項記載の多孔質材料。

**【請求項 3】**

細孔壁を構成する材料がケイ素を成分として含むことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の多孔質材料。

**【請求項 4】**

細孔壁を構成する材料がシリカであることを特徴とする請求項 3 記載の多孔質材料。

**【請求項 5】**

窒素ガス吸着測定により求められた前記メソ細孔の細孔径分布が、単一の極大値を有し、かつ 60% 以上の細孔が幅 10 nm 以下の細孔径分布の幅に含まれることを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の多孔質材料。

**【請求項 6】**

X 線回折分析において、1 nm 以上の構造周期に対応する角度領域に少なくとも 1 つの回折ピークを有することを特徴とする請求項 1 から 5 のいずれかに記載の多孔質材料。

**【請求項 7】**

前記メソ細孔、及びマクロ細孔の細孔表面に、細孔壁の成分とは異なる材料が形成されていることを特徴とする請求項第 1 から 6 のいずれかに記載の多孔質材料。

**【請求項 8】**

細孔表面に形成された前記細孔壁の成分とは異なる材料が有機物であることを特徴とする請求項 7 記載の多孔質材料。

**【請求項 9】**

細孔表面に形成された前記細孔壁の成分とは異なる材料が、無機酸化物材料であることを特徴とする請求項 7 記載の多孔質材料。

**【請求項 10】**

細孔表面に形成された前記細孔壁の成分とは異なる材料が、共有結合によって細孔表面に結合していることを特徴とする請求項 7 から 9 のいずれかに記載の多孔質材料。

**【請求項 11】**

請求項 1 から 10 のいずれかに記載の多孔質材料の細孔表面に、生体物質を固定化した、生体物質固定化材料。

**【請求項 12】**

前記生体物質の固定化が、van der Waals 力、静電的相互作用、水素結合、共有結合のいずれかによることを特徴とする請求項 11 に記載の生体物質固定化材料。

**【請求項 13】**

前記生体物質が、シングルストランド DNA 又はタンパク質であることを特徴とする請求項 11 又は 12 のいずれかに記載の生体物質固定化材料。

**【請求項 14】**

前記タンパク質が、抗原-抗体反応に関するタンパク質であることを特徴とする請求項 13 に記載の生体物質固定化材料。

**【請求項 15】**

前記タンパク質が、酵素であることを特徴とする請求項第 13 項記載の生体物質固定化材料。

**【請求項 16】**

請求項第 13 項乃至第 15 項に記載の生体物質固定化材料を含み構成される、生体物質

センシング素子。

【請求項 17】

枝分かれしたロッドを有する多孔体であって、前記ロッドは、短軸方向に配向したチューブ状のメソ孔を備え、且つ前記ロッドが三次元の網目状に配列することで、ロッド間にマクロ孔が形成されていることを特徴とする多孔体。

【請求項 18】

メソ孔を有する多孔体であって、枝分かれした棒状の骨格を備え、且つ前記メソ孔は、前記棒状の骨格の長軸を横切っている孔であることを特徴とする多孔体。

【書類名】明細書

【発明の名称】多孔質材料

【技術分野】

【0001】

本発明は、多孔質材料に関するものである。本発明は、より詳しくは、触媒担体、吸着剤、分離剤に用いられる多孔質材料に関するものである。本発明は、さらに詳しくは、生体物質の固定化に良好に用いることのできる、階層的な細孔構造を有する多孔質材料に関するものである。

【背景技術】

【0002】

熱や環境によって容易に立体構造が変化し、本来の機能を失うタンパク質を安定に扱うため、従来から種々の方法が検討されている。その1つに固体表面にタンパク質を担持する方法があり、例えば固定化酵素等実用化している技術である。

【0003】

タンパク質の固定化には、ゾルーゲル法で作成されたシリカや、熔融石英、多孔質の無機物、多孔質有機高分子材料等、様々なものが使用されている。近年では、界面活性剤の分子集合体を鋳型にして形成されるメソポーラス材料、特にメソポーラスシリカへの固定化が提案されている。

【非特許文献1】Journal of the American Chemical Society 第126巻第7740頁

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかし、従来のメソポーラスシリカにタンパク質を固定化する技術においては、いくつかの問題があった。すなわち、MCM-41やSBA-15のようなメソポーラスシリカの場合には、細孔径が比較的小さく、細孔内に担持できるタンパク質は、比較的小さいものに限定されていた。また、SBA-15のようなメソポーラスシリカは、ロッド状粒子の長軸方向に平行にチューブ状細孔径が形成されているために、チューブ状細孔のアスペクト比が大きく、細孔の内部へのタンパク質や基質の拡散が必ずしも良好ではなかった。また、表面における細孔の開口部の数が少なく、タンパク質の導入プロセスが遅くなることも多かった。

【0005】

このような課題に対しては、細孔のアスペクト比ができるだけ小さいメソポーラスシリカを使用することが重要になる。アスペクト比が小さいメソポーラスシリカ粒子に関しては、非特許文献1に記載されており、これは、ロッド状の粒子の担軸方向に平行にチューブ状メソ細孔が形成されている。しかしこの粒子は実際の使用形態である、カラム等に充填して使用する場合や、ペレット状にして使用する場合には、粒子同士が密に充填されることにより、メソ細孔へのタンパク質や基質の拡散が阻害されるという上記課題を解決できるものではなかった。

【課題を解決するための手段】

【0006】

そこで本発明は、枝分かれしたロッド状の形態を有する構成単位から形成される多孔質材料であって、前記ロッドの短軸方向に配向したチューブ状のメソ孔と、枝分かれしたロッド状構成単位が三次元的に網目状に配列することで、ロッド間に形成されるマクロ細孔とを併せ持つ多孔質材料を提供するものである。

【0007】

また、本発明は枝分かれしたロッドを有する多孔体であって、前記ロッドは、短軸方向に配向したチューブ状のメソ孔を備え、且つ前記ロッドが三次元の網目状に配列することで、ロッド間にマクロ孔が形成されている多孔体を提供するものである。

【0008】

さらに、メソ孔を有する多孔体であって、枝分かれした棒状の骨格を備え、且つ前記メソ孔は、前記棒状の骨格の長軸を横切っている孔である多孔体を提供するものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0010】

図1は、枝分かれしたロッド状のシリカが3次元的に網目状に配列した、マクロ細孔を有する多孔質材料において、メソ細孔がロッドの短軸方向に対して並行に形成された、階層的細孔を有する本発明の多孔体の模式図である。本発明の多孔体では、樹枝状の構造体が3次元的に絡み合って網目状の構造体を形成している。樹枝状構造体は規則的な配向をしないため、密に詰まった充填構造をとらない。それゆえに樹枝状構造体の間隙にはマクロ孔が形成される。このマクロ孔もまた規則的な構造である必要がない。本発明でいうメソ細孔とは、IUPACの定義によるもので、2 nmから50 nmの範囲の径の細孔をいい、マクロ孔とは、IUPACの定義によるもので、50 nm以上の範囲の径の細孔をいう。

【0011】

本発明のメソポーラス材料中では、樹枝状の構造体の短軸方向にチューブ状の細孔が配列している。チューブ状細孔は、典型的には図1に示すように細孔がハニカムパッキングしている。しかし、本発明の多孔質材料においては、チューブ状細孔がロッドの短軸方向にほぼ平行に形成されていれば良く、どのような配置のものでも良い。

【0012】

このメソポーラス材料の細孔は、界面活性剤分子集合体（ミセル）が形成するもので、ある条件においてはミセルを形成する分子の会合数が等しいために、同じ形の細孔が形成されるものである。ミセルの形状は、球状、チューブ状、層状など種々の形態が知られているが、本発明に関わるメソポーラス材料を形成するミセルの形状は基本的にチューブ状のものである。チューブ間は繋がっていても分離されていても良い。

【0013】

本発明のメソポーラス材料において、多孔質材料の細孔壁を形成する材料は、本発明の細孔構造を有するものであれば、どのようなものでも適用可能であるが、ケイ素を成分として含む材料が好ましく、特にシリカが好ましく用いられる。また、1以上の炭素原子を含有する有機基と、前記有機基と2箇所以上で結合する2以上のケイ素原子と、前記ケイ素原子と結合する1以上の酸素原子から構成される、有機シリカハイブリッド材料も好ましい。

【0014】

以下、ゾルゲル法を用いた短軸配向性樹枝状構造体の合成方法について説明する。

【0015】

反応溶液は、界面活性剤と有機分子、そして金属アルコキシド等の目的材料の原料になる物質を含む溶液である。細孔壁を形成する材料に応じて、加水分解反応触媒である酸等を適当量添加する場合もある。

【0016】

目的材料に応じて、原料としてハロゲン化物、カルコゲン化物、金属アルコキシド等が用いられる。例えば、細孔壁がシリカの場合には、金属アルコキシドであるテトラエトキシシランやテトラメトキシシランが好ましく用いられるが、特に限定は無く、アルコキシド以外のシリカ源でも本発明に適用可能である。

【0017】

使用する界面活性剤は、ポリエチレンオキシドを親水基として含む、ブロックコポリマーなどの非イオン性界面活性剤等が用いられる。しかし、使用可能な界面活性剤はこれらに限定されず、目的の構造が得られるものであれば特に限定しない。

【0018】

本発明のメソポーラス材料において、樹枝状構造体の短軸方向へのチューブ状メソ細孔

の配向制御および樹枝状構造体の3次元網目状配列は、添加する有機分子およびその添加量によって制御され、例えば *n-decane* を添加することによって、短軸方向に配向した細孔構造を有した分散性単一ロッド状メソポーラスシリカが合成される。しかし、本発明に適用できる有機分子、つまりメソ細孔を樹枝状構造体の短軸方向に配向させることが可能な有機分子は、本発明にかかる細孔構造を有するメソポーラス材料の形成を達成しえるものであれば、特に制限はなく、どのようなものを用いても良く、その添加量は適宜最適化される。

#### 【0019】

使用する酸も塩酸、硝酸のような一般的なものを使用することが可能である。

#### 【0020】

上記のような反応溶液を水熱条件下で反応させることにより、本発明のメソポーラス材料を合成することができる。合成させる際の温度は、120℃から150℃程度の温度領域において選択される。反応時間は数時間～数日程度で、反応温度や反応時間は適宜最適化される。

#### 【0021】

この様にして合成されたメソポーラス材料は、純水で洗浄した後に空气中で自然乾燥させ、細孔内に界面活性剤ミセルをテンプレートとして含む無機-有機複合粉末材料が得られる。

#### 【0022】

以上のように作製された無機-有機複合粉末材料からテンプレートの界面活性剤ミセルを除去することで、本発明の階層的細孔構造を有する樹枝状メソポーラス材料を作製することができる。界面活性剤の除去方法には、種々の方法があるが、細孔構造を破壊せずに界面活性剤を除去できる方法であれば、どのような方法を使用しても良い。

#### 【0023】

最も一般的に用いられる方法は、酸素を含んだ雰囲気中で焼成する方法である。例えば、合成した材料を空气中で、550℃において10時間焼成することによって、メソ細孔構造をほとんど破壊することなく、完全に界面活性剤を除去することができる。焼成温度と時間は、細孔壁を形成する材料と使用する界面活性剤により、最適化されるのが好ましい。

#### 【0024】

焼成以外の方法で界面活性剤を除去する方法として、溶剤による抽出や超臨界状態の流体による除去が知られている。また、焼成、抽出以外の方法として、オゾン酸化による除去も可能である。

#### 【0025】

このような方法で合成した粉末試料について、窒素ガス吸脱着測定を行い、細孔径に関する知見を得ることができる。本発明におけるメソポーラス材料の細孔径は、実質的に均一な径であることを特徴とする。ここでいう均一径の細孔とは、窒素ガス吸着測定の結果から、Berret-Joyner-Halenda (BJH) 法により評価される細孔径分布において、求められた細孔径分布が、単一の極大値を有し、かつ該細孔径分布において、60%以上の細孔が、10nmの幅を持つ範囲に含まれることを示す。尚、細孔径は、後に説明する界面活性剤を適宜選択することで変化させることができる。

#### 【0026】

細孔の周期構造はX線回折(XRD)測定によって知見を得ることが可能である。本発明におけるメソポーラス材料は、XRD測定において、1ナノメートル以上の構造周期に対応する角度領域に少なくとも1つの回折ピークを有することを特徴とする。

#### 【0027】

メソポーラス材料におけるメソ孔の存在は、一般的な粒子に比べ非常に高い比表面積を与え、またそのメソサイズの細孔径は高い吸着能を提供するため、触媒や生体物質の担持、吸着剤、充填剤として有効であることが一般的に知られている。しかし、粉末状のメソポーラス材料をペレット状や充填した場合には、粉末が密に詰まってしまうため、基質な

どの反応物質が細孔内に担持された物質と反応できない、または内部拡散に時間がかかってしまうといった問題点が存在する。マクロ細孔のような大きな細孔をもった材料は、内部拡散速度や細孔内部へのアクセスなどに優れるが、比表面積が小さくなってしまいうため、担持材料としては使用できなくなってしまう。本発明の階層的メソポーラス材料は、これらメソ細孔とマクロ細孔の両方の利点を併せ持っており、メソ細孔を利用した生体物質等の安定化および高比表面積と優れた内部拡散による高い反応性を達成した。

#### 【0028】

本発明による階層的メソポーラス材料のメソ細孔及びマクロ細孔の細孔表面には、細孔壁の成分とは異なる材料、例えば、有機物や金属酸化物の層を形成させることが可能である。

#### 【0029】

細孔表面を有機物で修飾する方法としては、シランカップリング剤で細孔表面を修飾する方法等が一般的に用いられ、無機酸化物で修飾方法としては、酸化物を形成し得る金属を含有する金属塩の水溶液を用いて細孔表面を修飾する方法等が一般的であるが、本発明に適用される細孔表面の修飾はこれらに限定わけではない。

#### 【0030】

シランカップリング剤は、一般的に  $R-Si-X_3$  の化学式で表される化合物で、分子中に2個以上の異なった官能基を持っている。上記Xは無機材料から成る多孔体表面と反応することができる部位である。例えば、メソポーラス材料がシリカである場合は、*Soil-Gel Science* 誌1989年第662頁に記述されているように、細孔表面に存在するシラノール基の水素が有機ケイ素基によって置換され、 $Si-O-Si-R$  結合を形成し、細孔表面に有機物Rの層を形成する。

#### 【0031】

Xとしては、クロル基、アルコキシ基、アセトキシ基、イソプロペノキシ基、アミノ基等が知られているが、本発明において特に限定はない。また、細孔表面と反応し、Rの層を形成することができれば、Xが三官能基のものでなくても、二官能基や一官能基のカップリング剤を用いても良い。

#### 【0032】

一方上記Rは有機基であり、アミノ基やカルボン基、マレイミド基等が好ましく用いられるが、上記有機基に限定したものではない。

#### 【0033】

次に、酸化物を形成し得る金属を含有する金属塩の水溶液を用いて細孔表面を修飾する方法について説明する。ここでいう酸化物とは、金属等の元素と酸素の結合を少なくとも1つ有する化合物の事を指す。酸化物層を形成し得る金属としては、チタン、アルミニウム、ジルコニウム、スズ等がある。例えば、メソポーラスシリカをオキシ硝酸ジルコニウムの水溶液で処理を行うことにより、表面にジルコニウムの酸化物層を形成することが可能である。ただし、細孔表面に金属酸化物の層を形成することができる金属塩の水溶液であれば、前記金属塩を構成する金属は、これらに限定されない。

#### 【0034】

さらに、本発明は、チューブ状のメソ孔およびマクロ孔、2種類の階層構造を有したメソポーラス材料内に、生体物質を固定化した生体物質固定化材料をも包含する。この生体物質生体物質固定化材料について説明する。

#### 【0035】

この生体物質を固定化した材料の構造の例を図2に、模式的に示した。この図において、21は前記樹脂状構造体であり、22はメソポーラス材料の細孔壁である。23はDNA、タンパク質、酵素、抗原等の生体物質であり、24はこれら生体物質と特異的結合性を持った基質や抗原、抗体のフラグメントである。

#### 【0036】

また、不図示ではあるが、22と23を連結するアンカーがあっても良い。このアンカーは生体物質の大きな構造変化を抑制して安定に維持する効果を与える場合もあるが、必



須の構成要素ではない。

【0037】

アンカーを構成する成分としては、メソポーラス材料と基本的には同じ構造が望ましく、特に生体物質に結合するために、水酸基、アミド基、アミノ基、ピリジン基、ウレア基、ウレタン基、カルボン基、フェノール基、アゾ基、ヒドロキシル基、マレイミド基、シラン誘導体、アミノアルキレン基などの官能基を有していることが好ましいが、それらに限定されない。

【0038】

個々の細孔には1個またはそれ以上の生体物質を収容する。したがって、この細孔は生体物質を固定化するのにちょうど良い適当な大きさが必要であり、適切な大きさは固定化する生体物質の大きさにより適宜決定される。

【0039】

細孔のサイズとそれに固定化する生体物質のサイズが適合する場合、生体物質表面は細孔壁に近接するため、生体物質は細孔壁からの *van der waals* 力により細孔内に吸着させることができる。*van der waals* 力による保持だけではなく、静電的結合、水素結合、イオン結合の非共有結合で活性ユニットを細孔内に保持することも可能である。

【0040】

固定化する生体物質としては、シングルストランドのDNAや抗体や抗原、タンパク質、酵素分子でも良く、またFab抗体などの活性部位を含む断片であっても良い。生体物質は、動植物や微生物から抽出し、所望によりそれを切断しても良く、また遺伝子工学的、化学的に合成しても良い。

【0041】

さらに本発明は、生体物質を固定化した生体物質固定化材料を利用したバイオセンシング素子をも包含する。上記生体物質固定化材料を用いたバイオセンシング素子は、抗原-抗体間やシングルDNA間等の特異的結合反応を電流、電圧、光量、質量、熱量等の変化を利用して目的物質の検出、測定を行う素子である。これら物理的、化学的变化を検知する装置として酵素電極、過酸化水素電極、ISFET、光ファイバ、サーミスタ、水晶振動子、表面プラズモン共鳴素子等が提案されているが、本発明は、該バイオセンシング素子を利用する装置やプロセス等において、上記本発明の生体物質固定化材料を用いる限りにおいては、その種類や構成を限定しない。

【0042】

一般にバイオセンシング素子を利用した測定の短時間化、高精度化に対しては、測定溶液内の特定物質の濃度が大きく影響する。例えば、測定溶液中の特定物質が非常に低濃度で存在していた場合、特定物質の拡散に時間がかかり、物理的、化学的变化が現れる、もしくは、定常化するまでに時間を要してしまう。また、現れる変化量も少なく検知が困難になる。よって、本発明のような、マクロ孔を有する階層的メソポーラス材料を利用したバイオセンシング素子は、メソ孔の高比表面積を利用した高い吸着能を利用して、微量分析を可能にし、マクロ孔による特定物質の内部拡散速度も速く、従来の装置と比較して、短時間化、高精度化が達成できる。

【0043】

以下、実施例を用いて、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は実施例の内容に限定されるものではない。

【実施例1】

【0044】

本実施例は、枝分かれしたロッド状のシリカが3次元的に網目状に配列した、マクロ細孔を有する多孔質材料において、実質的に均一なチューブ状メソ細孔がロッドの短軸方向に対して並行に形成された、階層的細孔を有するメソポーラスシリカを作製した例である。

【0045】

2. 40 g の非イオン界面活性剤であるトリブロックコポリマー ( $\text{EO}_{20}\text{PO}_{70}\text{EO}_{20}$ ;  $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_{70}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}\text{H}$ ) を 76.5 ml の純水に溶解し、さらに 7.5 ml の 36 wt. % 濃塩酸を添加し、室温で 30 分攪拌した。続いて、*n*-decane を 13.9 g 添加し、室温で 2 時間攪拌した。さらに、この混合溶液に加水分解触媒として  $\text{NH}_4\text{F}$  を 0.027 g、および 5.10 g のテトラエトキシシラン (TEOS) を添加したものを前駆溶液とした。最終的な前駆溶液の組成 (モル比) は、 $\text{TEOS}:\text{HCl}:\text{EO}_{20}\text{PO}_{70}\text{EO}_{20}:\text{NH}_4\text{F}:\text{n-decane}=25:90:0.4:0.7:100$  となるようにした。

#### 【0046】

この前駆体溶液を 40℃ において、20 時間攪拌し、120℃ で 48 時間反応させた。得られた白色沈殿物は純水で十分に洗浄し、真空乾燥させた。

#### 【0047】

得られた粉末試料を、空气中 550℃ で焼成し、細孔内から界面活性剤を分解・除去し、中空の細孔とした。界面活性剤等の有機物の除去は、赤外吸収スペクトルによって確認された。

#### 【0048】

合成されたメソポーラスシリカ粉末を X 線回折法により評価した結果、図 3 のように面間隔 11.7 nm のヘキサゴナル構造の (100) 面に帰属される回折ピークを始め、(110)、(200)、(210) 面に帰属される回折ピークを確認した。この結果は、このメソポーラスシリカの細孔構造が、高い規則性を持ったヘキサゴナル配列を有していることを示している。

#### 【0049】

77 K における窒素吸脱着等温線測定を行った結果、吸着等温線形状は IUPAC 分類における IV 型となった。B. E. T. 法によって算出された比表面積は  $700\text{ m}^2/\text{g}$  となり、細孔容量は  $1.88\text{ ml/g}$  となった。また、この吸着等温線の結果から、B. J. H 法により細孔径を算出すると、本実施例で合成したメソポーラスシリカの細孔径分布は、14.3 nm に単一のピークを有する狭い分布となり、細孔の 90% 以内が 10 nm の分布内に収まった。

#### 【0050】

次に、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察を行ったところ、図 4 のように無数の枝分かれたロッド状の構造体および、これらの構造体が 3 次元的に網目状に配列した構造を形成していた。この枝分かれたロッド状構造体の間隙には、300~500 nm のマクロ孔が形成されていた。さらに高倍率で SEM 観察を行ったところ、図 5 のように樹枝状構造体の短軸方向に直径 14 nm のチューブ状メソ細孔が配向していた。また、その断面図では図 6 のように、比較的均一なチューブ状のメソ細孔がハニカムパッキングした細孔構造を形成していた。尚、観察中に電子線によりメソ細孔構造が破壊されることはなかった。

#### 【0051】

次に、この階層的メソポーラスシリカのメソ細孔内に、酸化還元酵素の一種である西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP と略記、平均直径 = 4.8 nm、等電点 (IEP) = 7.2) を固定化させ、熱と有機溶媒に対する安定性を測定した。

#### 【0052】

5 mM のリン酸緩衝液 (pH = 7.4) を用いて HRP を  $5\text{ mg/ml}$  に調製し、この酵素溶液 1 ml 中に、合成した前記メソポーラスシリカを 10 mg 添加した。混合溶液は 4℃、20 時間の条件下でシェーカーを用いて攪拌し、HRP をメソポーラスシリカ細孔内に吸着させた。反応終了後、4℃、10 分、20000 g で遠心分離を行い、HRP-メソポーラスシリカの沈殿物は純水で 3 回洗浄した。この際、元の酵素溶液と上澄み液のそれぞれを、UV-Vis 吸光度測定を行った。HRP の 403 nm における吸収極大を利用し、吸着前後の濃度変化から HRP のメソポーラスシリカへの吸着量を算出した。洗浄後の酵素固定化メソポーラスシリカは、10 時間の凍結真空乾燥を行い、粉末試料を得

た。吸着したHRPはメソポーラスシリカの1gの重量に対し、252mg/gと高い値を示した。また、リン酸緩衝液のpHを変化させることによって、HRPの吸着量が変化した。この結果から、HRPとメソポーラスシリカ細孔は、静電的相互作用によって固定化されているものと考えられる。

#### 【0053】

細孔の中にHRP分子が導入されていることは、HRP吸着後のメソポーラスシリカにおける窒素吸着測定により、その細孔への吸着量が減少したことで確認した。

#### 【0054】

次に上記方法によって作製されたHRPを固定化した階層構造的メソポーラスシリカを用いて、トルエン中での酸化反応による有機溶媒への耐性およびフェノールの酸化反応による熱に対する安定性を測定した。

#### 【0055】

メソポーラスシリカに固定化されたHRPの有機溶媒中での酵素活性を評価するために、酸化剤にtert-butylhydroperoxideを用いた、トルエン中での1,2-diaminobenzeneの酸化反応を利用した。50mM 1,2-diaminobenzene in anhydrous tolueneを8mlとn-decaneにtert-butylhydroperoxideを溶解して調製した1.1M tert-butylhydroperoxide溶液2mlを混合した。この混合溶液1mlに上記方法によって調製されたHRP固定化メソポーラスシリカ10mgを加え、37℃で反応を開始し、1,2-diaminobenzeneの酸化によって生成する1,2-dinitrobenzeneの470nmでの吸光度を測定し、経時変化を求めることによってトルエン溶媒中でのHRPの酵素活性を決定した。

#### 【0056】

また比較試験としてHRPそのものを0.5mg調製し、上記の酸化反応を行い、同様に470nmでの吸光度の上昇を測定した。その結果を図7に示す。HRP(Free HRP)だけではトルエン中における酸化反応は全く起こらなかったが、HRPを固定化したメソポーラスシリカでは、非常に高い活性を示した。これは、トルエンにHRPを添加した直後にHRPが変性してしまったためであると考えられ、メソポーラスシリカにHRPを固定化することによって高い安定性を発現していることが分かった。

#### 【0057】

続いて、HRPを固定化したメソポーラスシリカおよび固定化していない通常のHRPをリン酸緩衝溶液中、70度で0~2時間熱処理した後に、残存の酵素活性を測定した結果を図8に示す。メソポーラスシリカ内に固定化されたHRPの熱安定性は、フェノールの酸化分解速度を測定することによって決定した。フェノールの定量は4-aminophtipiline比色法を用いた。

#### 【0058】

上記HRP吸着によって調製したHRP固定化メソポーラスシリカ10mgに、50mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH=4.0)400μlを加え、70℃で30、60、90、120分間それぞれ加熱した。加熱後遠心分離を行い、HRP固定化シリカを純水で2回洗浄した。次に50mM Tris-HCl(ヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩)緩衝液(pH=7.5)400μl、5000ppmフェノール水溶液8μl、30%過酸化水素水2μlを加えて、37℃にて30分間反応させた。遠心分離後、上澄み液を150μlと、1Mのグリシン水溶液(pH=9.6)で調製した、1% ferricyanideと、1% 4-aminophtipilineをそれぞれ、150μl、300μl 加え攪拌した後、すばやく500nm付近の吸光度を測定した。

#### 【0059】

固定化されていないHRPは、70℃、30分の熱処理により酵素活性が半減してしまい、2時間後には初期の酵素活性に対し約10%しか活性を示さなかった。これに対してHRPを固定化したメソポーラスシリカでは、熱に対する高い安定化効果が確認された。70℃、2時間の熱処理後も90%以上の酵素活性を有していた。

## 【0060】

上記のフェノールの酸化反応を用いて、HRPの温度依存性を測定した結果を図9に示した。HRPおよび固定化HRPは、25℃から100℃で、それぞれ30分前処理した後、酵素活性を測定した。通常のHRPが70℃、30分の条件下において、残存活性が0%になったのに対して、階層的メソポーラスに固定化したHRPは同条件下でも50%以上の活性を示した。また、100℃で処理をしても0%になることはなく、40%近くの酵素活性を保持していた。

## 【0061】

次にマクロ孔を持つことによる吸着物質の内部拡散の違いを検討するために、本発明によって調製された階層的ポーラス材料と、マクロ細孔を持たない単分散性のメソポーラス材料を合成し、これらを円板状のペレットに成型し、HRPの吸着挙動を測定した。

## 【0062】

上記合成方法によって合成された階層的ポーラスシリカと、マクロ細孔を有していない単分散性のメソポーラスシリカの焼成粉末の各0.2gは、錠剤成型用の加圧器を用いて、直径15mm、厚さ1mmの円板状のペレットに成型された。5mMのリン酸緩衝液(pH=7.4)を用いてHRPを5mg/mlに調製し、このHRP溶液5ml中に各ペレット状メソポーラスシリカを加えた。混合溶液は4℃、48時間、シェーカーを用いてゆっくり振とうし、HRPを各メソポーラスシリカに吸着させ、HRP溶液の403nmにおける吸収波長の変動より、吸着量の経時変化を測定した。本発明による階層的ポーラスシリカは、吸着開始から約1時間で相対吸着量80%以上の吸着を示した。この吸着量の値は、成型前の焼成粉末の場合と比較しても、ほぼ同じ値であった。しかし、マクロ細孔を持たないメソポーラス材料は、ペレット状に成型することによって、吸着速度が大きく減少した。これは、本発明の階層的ポーラス材料が成型ペレット中においてもマクロ孔を形成しており、高い内部拡散速度を維持しているためであると本発明者らは考察している。

## 【0063】

## (比較例1)

比較例として、ロッド状粒子の長軸方向に平行にチューブ状細孔径が形成されているSBA-15を合成し、HRPの吸着及び有機溶媒中の安定効果を測定した。SBA-15の合成方法は、例えば、Science誌第279号第548頁に記載されている。

## 【0064】

合成したSBA-15をX線回折法により評価した結果、面間隔9.8nmのヘキサゴナル構造の(100)面に帰属される回折ピークを確認した。また、窒素吸着等温線測定より、合成したSBA-15は800m<sup>2</sup>/gの比表面積と7.4nmの細孔径を有していた。

## 【0065】

合成したSBA-15を実施例1と同様のHRP吸着実験を行った。HRPの吸着量は25mg/gとなり、本発明者らが合成した階層的メソポーラスシリカに比べ、1/10以下の非常に少ない吸着量を示した。また、HRP吸着後の試料を用いた窒素吸着等温線解析から、HRPの吸着前後でSBA-15の細孔容量に減少が見られず、HRPがSBA-15細孔内にほとんど吸着していないことが分かった。HRPの平均直径が4.8nm、SBA-15の細孔径が7.4nmであることを考慮すると、細孔内への吸着が起こるのに、構造的な影響は少ないものと考えられる。

## 【0066】

次に、各メソポーラスシリカへのHRPの経時吸着量を測定した結果、飽和吸着量に達する時間が、本発明によるマクロ細孔を有した階層的メソポーラスシリカにおいて非常に短かった。

## 【0067】

続いて、このSBA-15を用いて上記方法によるHRPの有機溶媒安定性の測定を行い、本発明による階層的メソポーラスシリカとの比較を行った。僅かにSBA-15に固

定化されたHRPによる酵素活性が観察された。しかし、SBA-15固定化HRPにおいて、反応開始と共に徐々に反応生成物である1, 2-dinitrobenzeneが確認されたのに対し、階層的メソポーラスシリカでは、反応開始直後からSBA-15に比べて10倍以上の1, 2-dinitrobenzeneが確認された。

#### 【0068】

したがって、本発明者らはこれらの結果を、SBA-15ではロッド状粒子の長軸方向に平行にチューブ状細孔径が形成されているためにチューブ状細孔のアスペクト比が大きく、外部から細孔の内部、および細孔内部から外部へのHRPや基質の拡散が悪いこと、および、表面における細孔の開口部の数が少ないため、HRPや基質の導入が遅くなることが原因であると推察した。この結果から、本発明者らが合成した階層的メソポーラスシリカが、マクロ細孔を持つことによってタンパク質や基質の内部拡散に優れ、生体物質等の担持剤として優れている点が明らかになった。

#### 【実施例2】

##### 【0069】

本実施例は、実施例1で作製した階層的メソポーラスシリカ表面をジルコニウムの酸化物で修飾し、酸化還元酵素の一種であるグルコースオキシダーゼ（GODと略記、直径=8.0nm、IEP=4.6）を固定化させ、熱に対する安定性を測定した例である。

##### 【0070】

オキシ硝酸ジルコニウム2水和物10gを純水90mlに添加し、室温で溶解させ、10wt%のオキシ硝酸ジルコニウム水溶液を調製した。この溶液に実施例1で合成した階層的メソポーラスシリカを添加して、20時間浸漬させた。その後、遠心分離により上澄みを取り除き、純水で3回洗浄し、室温で乾燥させた。

##### 【0071】

ジルコニウムで修飾した階層的メソポーラスシリカをX線回折法により評価した結果、修飾前とはほぼ同様の回折パターンを示し、メソ細孔の周期構造が壊れていないことを確認した。また、X線光電子分光分析（XPS）を用いてシリカ表面の化学結合状態を測定した結果、Zr-Oに起因するピークが確認され、シリカ表面にジルコニウムの酸化物層が形成されていることを確認した。

##### 【0072】

続いて、ジルコニウム修飾後の階層的メソポーラスシリカの細孔内にGODを固定化し、フェノールの酸化分解反応を用いて、安定化効果を測定した。

##### 【0073】

5mMのリン酸緩衝液（pH=5.0）を用いてGODを5mg/mlに調製し、このGOD溶液1ml中に前記ジルコニウム処理した階層的メソポーラスシリカを10mg加えた。混合溶液は4℃、20時間の条件下でシェーカーを用いて攪拌し、GODをメソポーラスシリカ細孔内に固定化させた。吸着後、4℃、10分、20000gで遠心分離を行い、GOD固定化シリカを得た。GOD固定化前後の上澄み溶液における280nmの吸収極大を利用し、メソポーラスシリカへのGODの吸着量を算出した。GODは120mg/g以上の吸着量を示した。細孔の中に酵素分子が導入されていることは、窒素吸着測定装置により、その細孔への吸着量が減少したことで確認した。また、ジルコニウム処理をしていないメソポーラスシリカでは、GDOはほとんど吸着しなかった。

##### 【0074】

上記GOD吸着によって調製したGOD固定化メソポーラスシリカおよびGOD固定化SBA-15の各10mgに、50mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH=4.0）400μlを加え、70℃で30、60、90、120分間それぞれ加熱した。加熱後遠心分離を行い、GOD固定化シリカを純水で2回洗浄した。次に50mM Tris-HCl緩衝液（pH=7.5）400μl、10% β-D-グルコース水溶液100μl、5000ppmフェノール水溶液8μl、100μl/mlのHRP溶液100μlを加えて、37℃にて30分間反応させた。遠心分離後、上澄み液を150μlと、1Mのグリシン水溶液（pH=9.6）で調製した、1% ferricyanideと、1% 4-

aminoantipyrileneをそれぞれ、 $150\mu\text{l}$ 、 $300\mu\text{l}$ 加え攪拌した後、すばやく $500\text{nm}$ 付近の吸光度を測定した。

#### 【0075】

固定化されていないGODは、 $70^\circ\text{C}$ 、30分の熱処理により相対活性が0%と失活した。これに対してメソポーラスシリカに固定化したGODでは、熱に対する高い安定化効果が確認され、 $70^\circ\text{C}$ 、120分の熱処理後も70%以上の酵素活性を有していた。

#### 【0076】

また、熱処理を行っていないGODを固定化した本発明の階層的メソポーラスシリカを用いて、 $37^\circ\text{C}$ におけるフェノール分解の経時変化を測定した。

#### 【0077】

上記GOD吸着によって調製したGOD固定化メソポーラスシリカ $10\text{mg}$ に、 $50\text{mM}$  Tris-HCl緩衝液 ( $\text{pH}=7.5$ )  $400\mu\text{l}$ 、10%  $\beta$ -D-グルコース水溶液 $100\mu\text{l}$ 、 $5000\text{ppm}$ フェノール水溶液  $8\mu\text{l}$ 、 $100\mu\text{g/ml}$ のHRP溶液 $100\mu\text{l}$ を加えて、 $37^\circ\text{C}$ にて所定時間反応させた。遠心分離後、上澄み液を $150\mu\text{l}$ と、 $1\text{M}$ のグリシン水溶液 ( $\text{pH}=9.6$ )で調製した、1% ferricyanideと、1% 4-aminoantipyrileneをそれぞれ、 $150\mu\text{l}$ 、 $300\mu\text{l}$ 加え攪拌した後、すばやく $500\text{nm}$ 付近の吸光度を測定した。この結果より、30分後のフェノール分解濃度に対する相対活性を算出した。階層的メソポーラスシリカに固定化したGODは、5分間の反応において100%の相対活性を示した。

#### 【0078】

これらの結果から、マクロ孔を有する階層的メソポーラスシリカは、そのマクロ孔による高い内部拡散を有していながら、メソ孔内に固定化した酵素は高い安定効果を発現していることが明らかとなった。

#### 【0079】

また、実施例1と同様にペレット状の階層的メソポーラスシリカと、マクロ細孔を有していない単分散性のメソポーラスシリカを用いて、GODの吸着実験を行った。上記方法によるオキシ硝酸ジルコニウム水溶液に両方のペレットを含浸させジルコニウム処理を行った後、GODの経時吸着挙動を測定した。実施例1と同様に、本発明によるペレット状の階層的メソポーラスシリカは、成型前の粉末状の吸着挙動に比べ変化がなかった。しかし、マクロ細孔を有していない単分散性のメソポーラスシリカによるペレットでは、ほとんどGODが吸着しなかった。これは、ペレット状の単分散性メソポーラスシリカにおいては粒子同士が密に充填してしまうために内部拡散が遅く、メソ孔内にGODが十分に拡散できなかったためであると考察される。

#### 【実施例3】

#### 【0080】

本実施例は、実施例1で合成した階層的メソポーラスシリカの表面を、シランカップリング剤を用いて修飾し、 $\alpha$ -アミラーゼを共有結合によってシリカ表面に固定化させた例である。

#### 【0081】

実施例1で合成した階層的メソポーラスシリカ $1.0\text{g}$ を、トルエンで調製した10% (v/v) の3-aminopropyl triethoxysilane溶液の $50\text{ml}$ 中に添加し、この溶液を窒素雰囲気下において、 $120^\circ\text{C}$ で48時間、攪拌した。反応後、沈殿物は濾過し、トルエン、メタノール、ジクロロメタンで洗浄した後、室温で乾燥させた。

次にこの乾燥試料の $1.0\text{g}$ を、リン酸緩衝溶液 ( $\text{pH}=6.6$ )で調製した2.5% glutaraldehyde溶液の $25\text{ml}$ に溶解させ、室温で1時間攪拌した。得られた沈殿物は純水を用いて4回以上洗浄し、その後室温において乾燥した。

#### 【0082】

Glutaraldehydeで修飾した階層的メソポーラスシリカをX線回折法により評価した結果、修飾前とほぼ同様の回折パターンを示しており、メソ細孔構造が壊れて

いないことを確認した。また、FT-IRを用いてシリカ表面に導入した官能基の同定を行った結果、 $R-CH=N$ 、 $C=O$ 、 $-CHO$ に起因するピークがそれぞれ確認され、シリカ表面に $Si(CH_2)_3N=CH(CH_2)_3CHO$ が共有結合していることを確認した。

#### 【0083】

続いて、修飾後の階層的メソポーラスシリカの細孔内に $\alpha$ -アミラーゼを固定化し、澱粉のマルトースへの加水分解反応を用いて、安定化効果を測定した。

#### 【0084】

50 mMのリン酸緩衝液(pH=6.0)を用いて $\alpha$ -アミラーゼを1 mg/mlに調製し、この溶液1 ml中に、上記方法で合成・修飾した階層的メソポーラスシリカ0.2 gを実施例1と同様にペレット状に成型したものを添加した。混合溶液は4℃、20時間の条件下でシェーカーを用いて含浸させ、 $\alpha$ -アミラーゼをメソポーラスシリカ細孔内に吸着させた。反応終了後、ペレットを濾過して、純水で3回洗浄した。この際、元の酵素溶液と上澄み液のそれぞれを、UV-Vis吸光度測定を行った。 $\alpha$ -アミラーゼの280 nmにおける吸収極大を利用し、吸着前後の濃度変化からメソポーラスシリカへの吸着量を算出した。吸着した $\alpha$ -アミラーゼは140 mg/gと高い値を示した。表面修飾を行わなかった粉末状階層的メソポーラスシリカおよびペレット状に成型した単分散性メソポーラスシリカへの、同条件での $\alpha$ -アミラーゼの吸着実験では、ほとんど吸着挙動を示さなかった。したがって、マクロ細孔による高い内部拡散により、 $\alpha$ -アミラーゼがシリカ表面に修飾した $-CHO$ および $\alpha$ -アミラーゼの $-NH_2$ と結合し、シリカ表面に固定化されたものと考えられる。

#### 【0085】

続いて、ペレット状のアミラーゼ固定化メソポーラスシリカおよび固定化していないアミラーゼを酢酸ナトリウム緩衝溶液中、25℃から70℃でそれぞれ熱処理した後、酵素活性を測定した。

#### 【0086】

上記アミラーゼ固定化メソポーラスシリカ10 mgに、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH=5.0) 400  $\mu$ lを加え、25℃から70℃で、それぞれ30分処理した。加熱後遠心分離を行い、アミラーゼ固定化シリカを純水で2回洗浄した。同様の50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液を用いて、0.125%の可溶性澱粉を調製し、この澱粉溶液の300  $\mu$ lを洗浄後のアミラーゼ固定化シリカに添加し、40℃で15分反応させた。反応停止後、遠心分離により上澄みを得て、この上澄み溶液に1 mlの0.5 N酢酸及びヨウ素-カリウム溶液(0.015%ヨウ素-0.15%ヨウ化カリウム溶液)を3 ml加え、よく攪拌してから700 nmにおける吸収極大を測定した。通常の $\alpha$ -アミラーゼが60℃、30分の条件下において、相対活性が20%になったのに対して、階層的メソポーラスに固定化した $\alpha$ -アミラーゼでは、同条件下において90%以上の相対活性を示し、安定化効果が確認された。しかし、37℃における澱粉の分解量は、固定化していない $\alpha$ -アミラーゼが固定化アミラーゼよりも2倍以上も高く、固定化アミラーゼの酵素活性は低下することが示された。これは、アミラーゼが共有結合によってシリカ表面に固定化されたために立体構造の自由度が規制され、十分な酵素反応が得られなかったためであると考えられる。

#### 【実施例4】

#### 【0087】

本実施例は、実施例1で作製した階層的メソポーラスシリカのメソ細孔表面にシングルストランドのDNAを導入し、ハイブリダイゼーション反応を利用して、シングルDNA間の特異的反応を光学的に検出するバイオセンシング素子の一例であり、図10はバイオセンシング素子の構成の一例を示す図である。

#### 【0088】

ハイブリダイゼーションは核酸のハイブリッド形成または核酸雑種分子形成のことを言い、核酸の1次構造、すなわち塩基配列の相同性を調べたり、相同の塩基配列をもつ核酸

を検出したりする方法として用いられる。1本鎖にした核酸同士が、相補性をもつ塩基対間 (A-T、G-C) で水素結合ができ、二重螺旋の2本鎖核酸を形成する性質を利用するものである。

#### 【0089】

実施例1で合成した階層的メソポーラスシリカおよび比較例1で使用したSBA-15を10%の3-aminopropyl triethoxysilaneの95%エタノール水溶液に1時間浸し、遠心分離機を用いて未反応溶液を除去した。エタノール洗浄した後、窒素雰囲気下において120℃で1時間反応させ、メソポーラスシリカ細孔表面にアミノ基を導入した。さらに、アミノ基が導入された階層的メソポーラスシリカを1mMのGMB Sジメチルスルホキシド溶液に2時間浸した後にジメチルスルホキシドで洗浄し、メソポーラスシリカ細孔表面にマレイミド基を導入した。シリカ表面に各官能基が導入されたことは、FT-IRによって確認された。

#### 【0090】

DNA自動合成機を用いてチオール基が導入されたDNAプローブを合成した後、高速液体クロマトグラフィーでDNAプローブを精製した。

DNAプローブ;  $\text{HS}-(\text{CH}_2)_6-\text{O}-\text{PO}_2-\text{O}-5'-\text{ataaaagtg}$   
 $\text{cacacctta}-3'$

#### 【0091】

次に、合成・精製された濃度2  $\mu\text{M}$ のDNAプローブ1の10  $\mu\text{l}$ とHEPES緩衝溶液 (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N, -2-エタンスルホン酸; 10mM、pH=6.5) 40  $\mu\text{l}$ と添加剤 (エチレングリコール) 50  $\mu\text{l}$ とを混合し、反応溶液を調製した。この混合溶液を、マレイミド基を導入した階層的メソポーラスシリカに添加し、室温で2時間放置することによってメソポーラスシリカ表面にシングルストランドのDNAを固定化した。

#### 【0092】

このDNAプローブ固定化メソポーラスシリカを図10のチップ基板上溝に充填し、その他の流路を図10のように設置することでバイオセンシング素子を作製した。この図において、101は基板であり、102は、本実施例により作製したDNAプローブを固定化した階層的メソポーラスシリカである。103および104は溶液導入管であり、105はそれら溶液を導入した後の溶液排出管である。

#### 【0093】

DNA自動合成機を用いてDNAプローブと相補的な塩基配列を持ち、5'末端がテキサスレッドで蛍光標識されたDNAターゲットを合成した。次に、濃度0.1  $\mu\text{M}$ のDNAターゲット80  $\mu\text{l}$ と20×SSC (0.3M クエン酸ナトリウム、3.0M 塩化ナトリウム) 17  $\mu\text{l}$ と10%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液3  $\mu\text{l}$ とを混合してハイブリダイゼーション溶液を調製し、図10の103の溶液導入管から導入した。所定時間静止後、105の溶液排出管から溶液を排出した。

#### 【0094】

所定時間のハイブリダイゼーション反応後、20×SSCの100倍希釈液を洗浄液として、104の洗浄液導入管より注入し、洗浄した。次に、マイクロアレイ用スキャナーを用いてDNAプローブが固定化された部分の蛍光強度 (ハイブリダイゼーションシグナル) とDNAプローブが固定化されていない試料の蛍光強度 (バックグラウンドシグナル) を測定した。

#### 【0095】

DNAプローブ固定化SBA-15は、ハイブリダイゼーションシグナルが小さく、高い蛍光強度比 (ハイブリダイゼーションシグナル/バックグラウンドシグナル) を達成できなかった。また、ハイブリダイゼーション反応による蛍光強度の経時変化を測定したところ、飽和強度に達するまでの時間も長かった。これに対して、DNAプローブ固定化階層的メソポーラスシリカは、非常に短時間でハイブリダイゼーション反応が完了しており、かつ優れた蛍光強度比を達成していた。これらの結果は、階層的メソポーラスシリカメソ



細孔内へのDNAプローブの高い吸着量が、蛍光のシグナルを増加させ、かつマクロ孔による優れた内部拡散が短時間でのハイブリダイゼーション反応の完了に繋がったと推察される。

#### 【0096】

以上の結果より、本実施例では、上記の生体物質固定化階層的メソポーラスシリカを用いることで、高感度な検出が短時間で行えるバイオセンシング素子の作製が可能となることを確認された。

#### 【実施例5】

#### 【0097】

実施例1で合成した階層的メソポーラスシリカの細孔内に、マウスモノクローナル抗体（抗原はヒト血清アルブミン）を固定化させ、抗原-抗体間の特異的結合反応を利用して、目的物質の検出・測定を行った例である。

#### 【0098】

実施例1で合成した階層的メソポーラスシリカおよび比較例1で使用したSBA-15各10mgに、マウスモノクローナルFab型抗体を純水で1mg/mlに調製した溶液を10ml添加し、4℃で6時間攪拌することにより、メソポーラスシリカのメソ細孔内に抗体を固定化させた。その後、純水で3回洗浄した。上記の抗体固定化メソポーラスシリカに、西洋わさびペルオキシダーゼで標識したヒト血清アルブミン（HRP-HSAと略記）溶液を添加し、室温にて所定時間（1～4時間）反応させた。非特異吸着したHRP-HSAを除くために、この抗原-抗体固定化メソポーラスシリカを純水で数回洗浄した。その後、凍結真空乾燥を行い、この乾燥試料を37℃で任意の時間放置した。次に50mM Tris-HCl（pH=7.5）400μl、5000ppmフェノール水溶液8μl、30%過酸化水素水2μlを加えて、37℃にて30分間反応させた。遠心分離後、上澄み液を150μlと、1Mのグリシン水溶液（pH=9.6）で調製した、1% ferricyanideと、1% 4-aminoantipilineをそれぞれ、150μl、300μl加え攪拌した後、すばやく500nm付近の吸光度を測定し、固定化された抗体に特異的に結合したHSAに標識されたHRPの酵素活性を測定した。

#### 【0099】

また、前記階層的メソポーラスシリカに対して、HRP-HSAの抗体ではない非特異的なマウスIgG（マウスIg）を上記の方法と同様にして固定化し、前述のHSAに特異的な結合をする抗体と、非特異的な抗体とを用いた場合の両者の吸光度の差を上記手順により測定した。その結果、非特異的なマウスIgは、本実施例によるマウスモノクローナルFab型抗体固定化メソポーラスシリカに比べ、HRP活性が明らかに小さかった。これらの結果より、メソポーラスシリカに抗体が固定化され、かつメソポーラスシリカへの抗体の固定化後も、細孔内において有効に抗原抗体反応が起きていることを確認した。

#### 【0100】

上記の抗体固定化メソポーラスシリカに、HRP-HSA溶液を添加し、室温で所定時間（1～4時間）反応させることにより、抗原抗体反応の経時変化を測定した。その結果、実施例2、3、4で確認されたように、階層的メソポーラスシリカを利用した場合においてのみ、高い抗原抗体反応速度を確認した。これは、非特異吸着により細孔外に吸着したHRP-HSA等の細孔内に固定化されていないHRP-HSAが、外部環境の影響により変性してしまい、安定化されなかったためであると考えられる。

#### 【0101】

また、上記で得た抗体固定化メソポーラスシリカと固定化していないマウスモノクローナル抗体粉末を乾燥状態において37℃で3週間保存し、抗原抗体反応によるHRP活性の経時変化を測定した。37℃で乾燥保存を開始する直前の両者の結合活性を100とした結果、固定化していないマウスモノクローナル抗体は1週間後には相対活性が0となり、完全に失活してしまった。一方、階層的メソポーラスシリカに固定化したマウスモノク

ローナル抗体の抗原抗体反応は、3週間後においても90%以上の相対活性を示した。

#### 【0102】

以上説明したように、本発明によれば、適切な反応条件を用いることによって、樹枝状構造体の短軸方向に、実質的に均一なチューブ状の細孔を配向させることができる。また、それら樹枝状構造体が互いに3次元的に重なり合うことで、その間隙にマクロ孔を形成させることができ、メソ細孔とマクロ細孔、2種類の細孔構造を有した階層的ポラス材料の合成が可能となる。また、この階層構造を有するメソポラス材料は、内部拡散に優れ、生体物質の固定化剤やカラム剤の高精度化などに利用することができる。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0103】

本発明は、バイオセンサーや分子の分離フィルター等の利用可能である。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0104】

【図1】本発明のメソポラス材料における2種類の細孔構造を説明するための模式図である。

【図2】本発明の実施例1で合成された階層的ポラス材料を利用した安定化酵素の構造の模式図である。

【図3】本発明の実施例1で合成された階層的ポラス材料のX線回折の結果である。

【図4】本発明の実施例1で合成された階層的ポラス材料の走査型電子顕微鏡の写真である。

【図5】本発明の実施例1で合成された階層的ポラス材料の走査型電子顕微鏡の高倍率写真である。

【図6】図4で示された樹枝状構造体の断面における走査型電子顕微鏡の高倍率写真である。

【図7】実施例1で合成された階層的ポラス材料内にペルオキシダーゼを固定化し、トルエン中で酵素反応を行った場合の、転化率と時間経過を示すグラフである。

【図8】実施例1で合成された階層的ポラス材料内にペルオキシダーゼを固定化し、70℃で熱処理を行った場合の、酵素の相対活性と熱処理時間の関係を示すグラフである。

【図9】実施例1で合成された階層的ポラス材料内にペルオキシダーゼを固定化し、所定の温度で30分熱処理した場合の相対活性の温度依存性を示すグラフである。

【図10】実施例1で合成された階層的ポラス材料を利用したバイオセンシング素子の一例である。

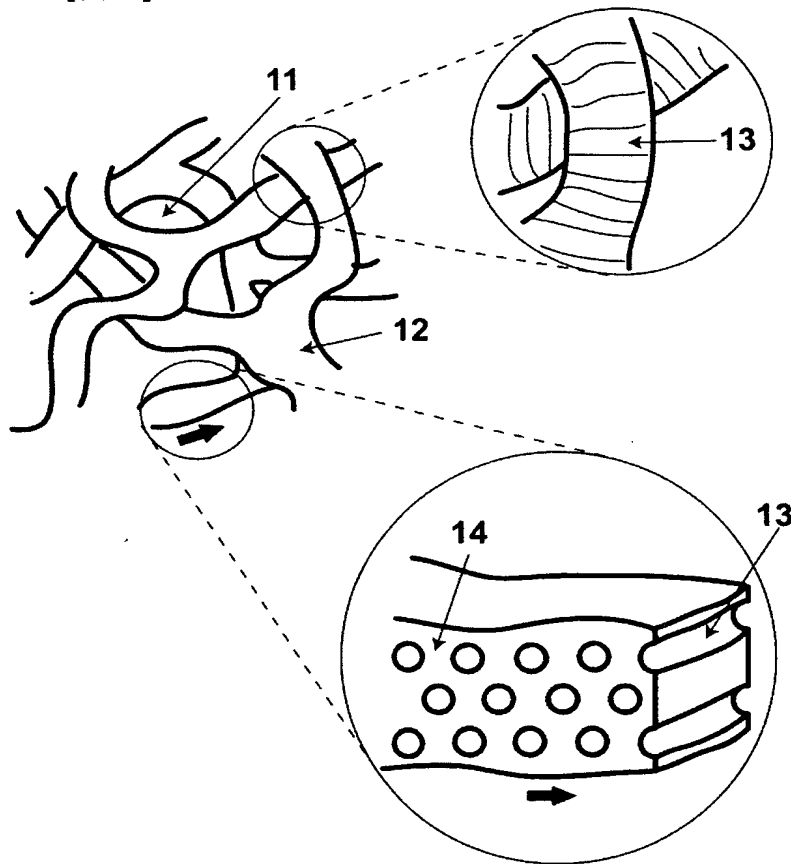
#### 【符号の説明】

#### 【0105】

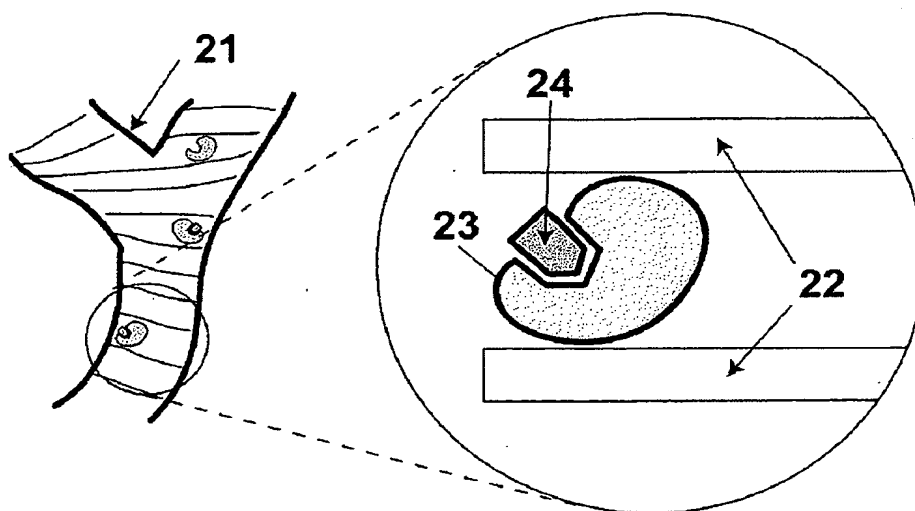
- 11 マクロ細孔
- 12 メソ孔を有した樹枝状構造体
- 13 メソ細孔
- 14 細孔壁
- 21 樹脂状構造体
- 22 細孔壁
- 23 DNAやタンパク質を始めとする生体物質
- 24 生体物質と特異的結合をする基質などのフラグメント
- 101 基板
- 102 DNAプローブや抗体を固定化した本発明による樹脂状構造体
- 103 溶液導入管
- 104 洗浄液導入管
- 105 溶液排出管

【書類名】 図面

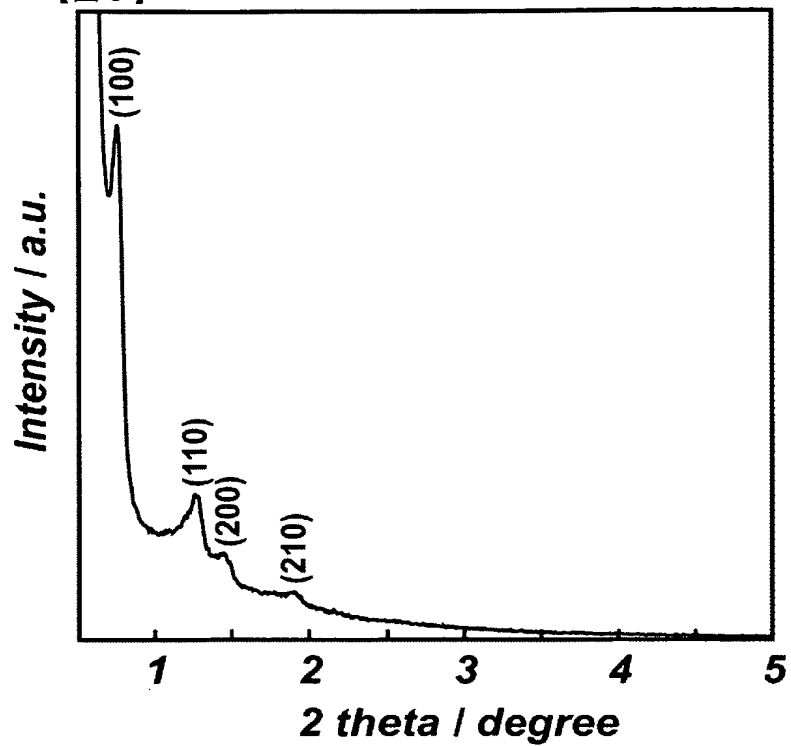
【図 1】



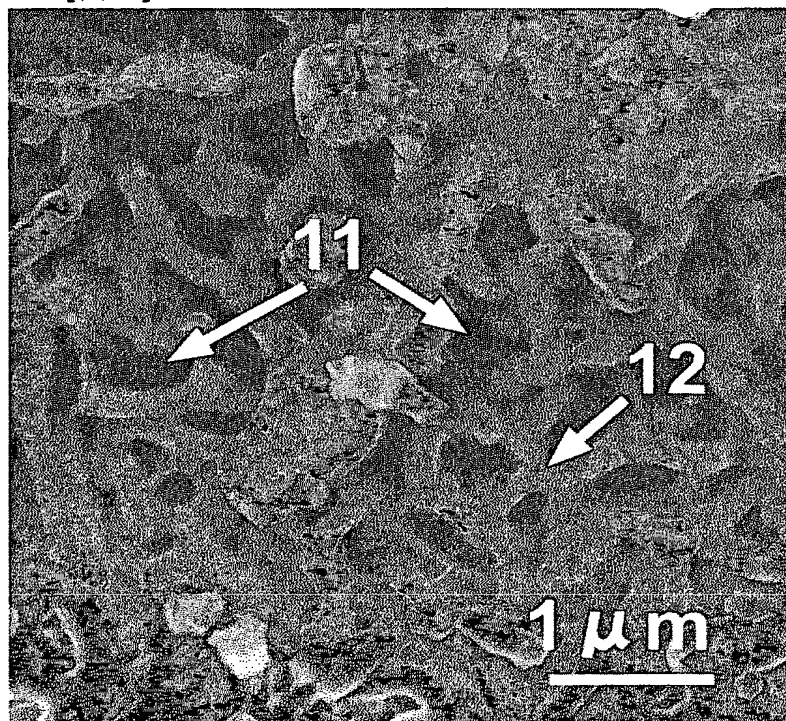
【図 2】



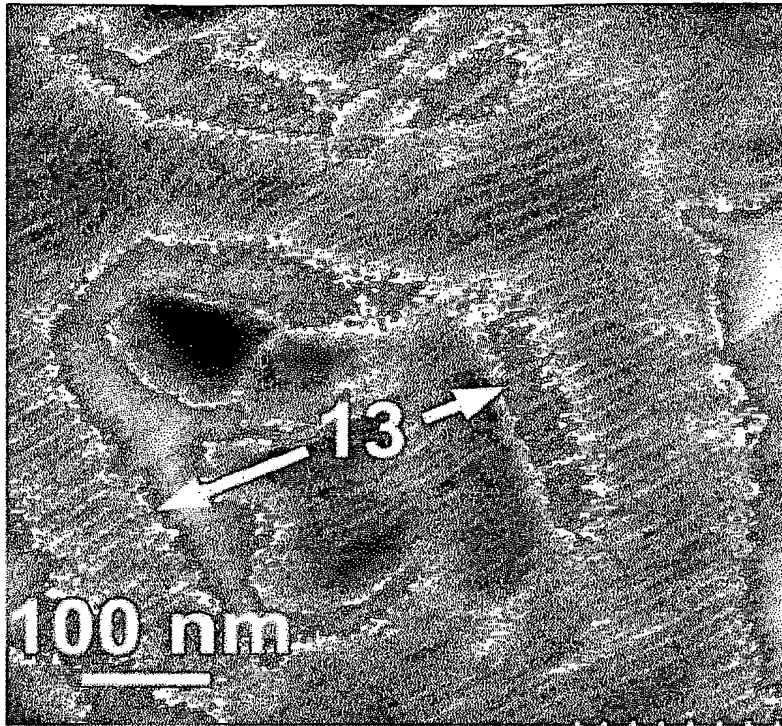
【図 3】



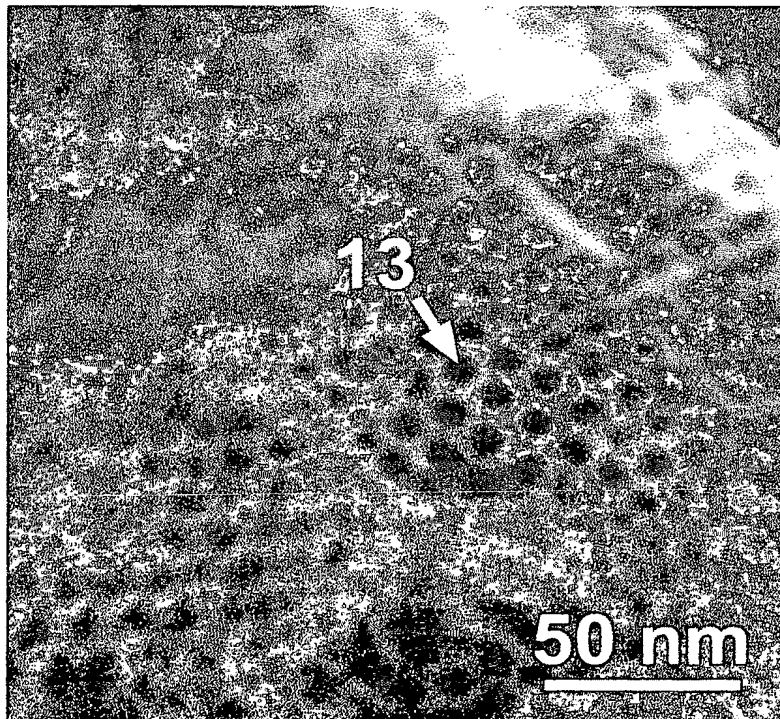
【図 4】



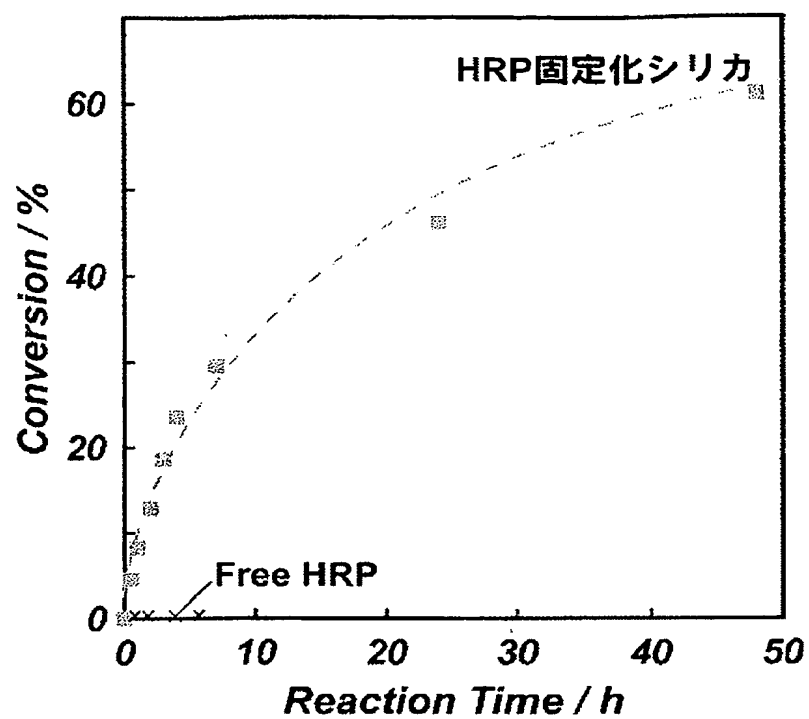
【図 5】



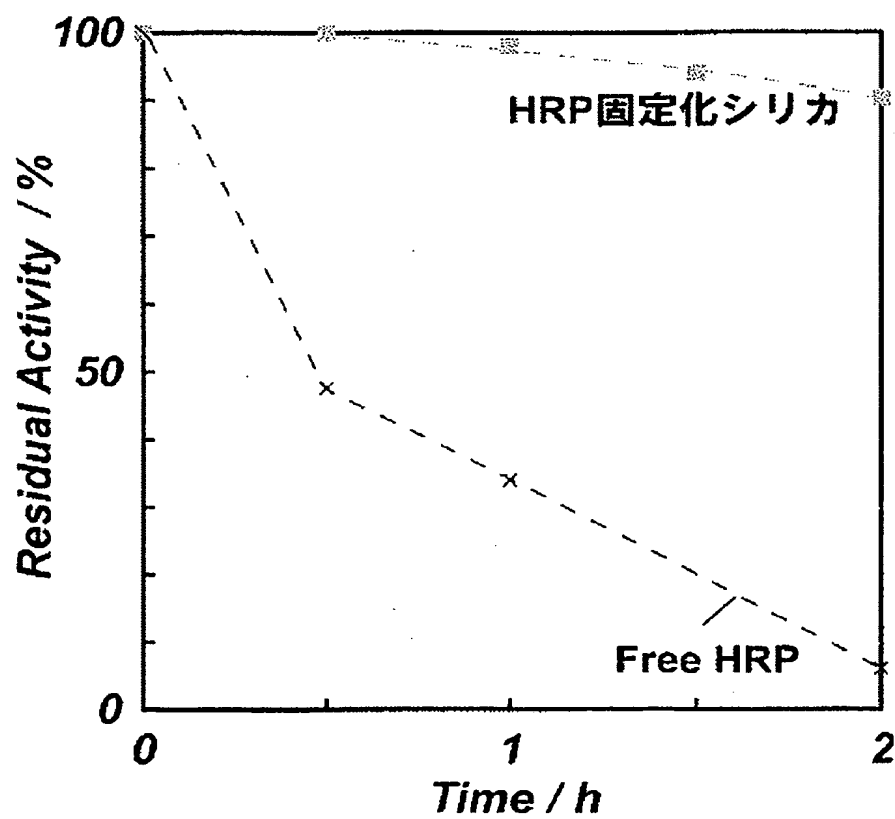
【図 6】



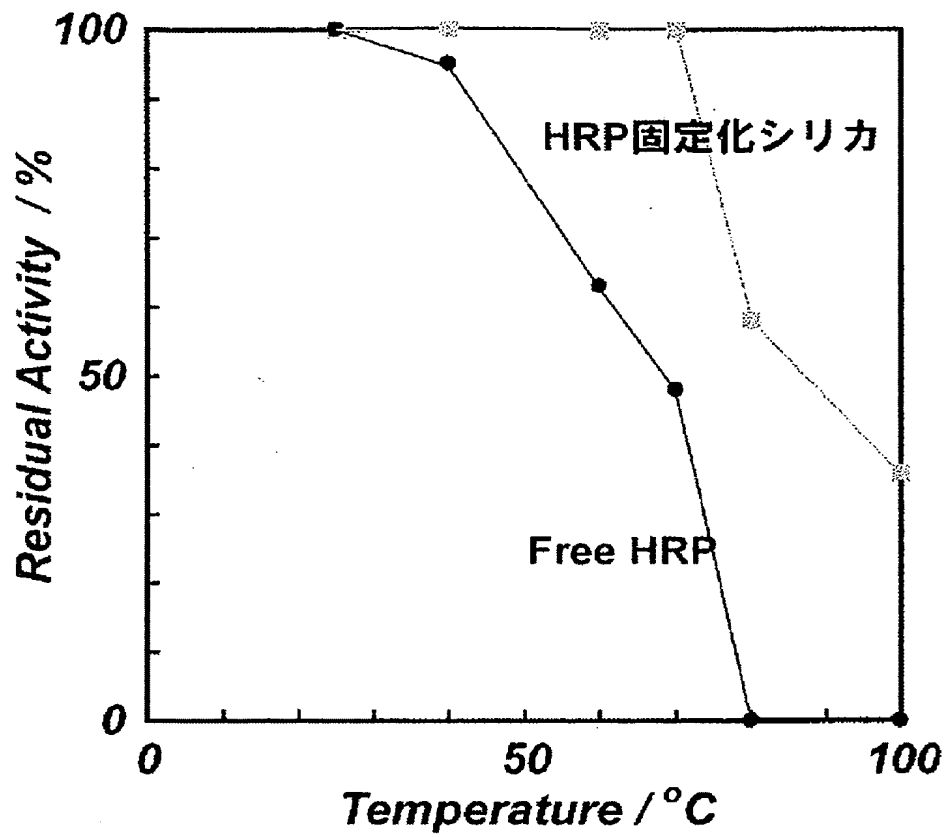
【図7】



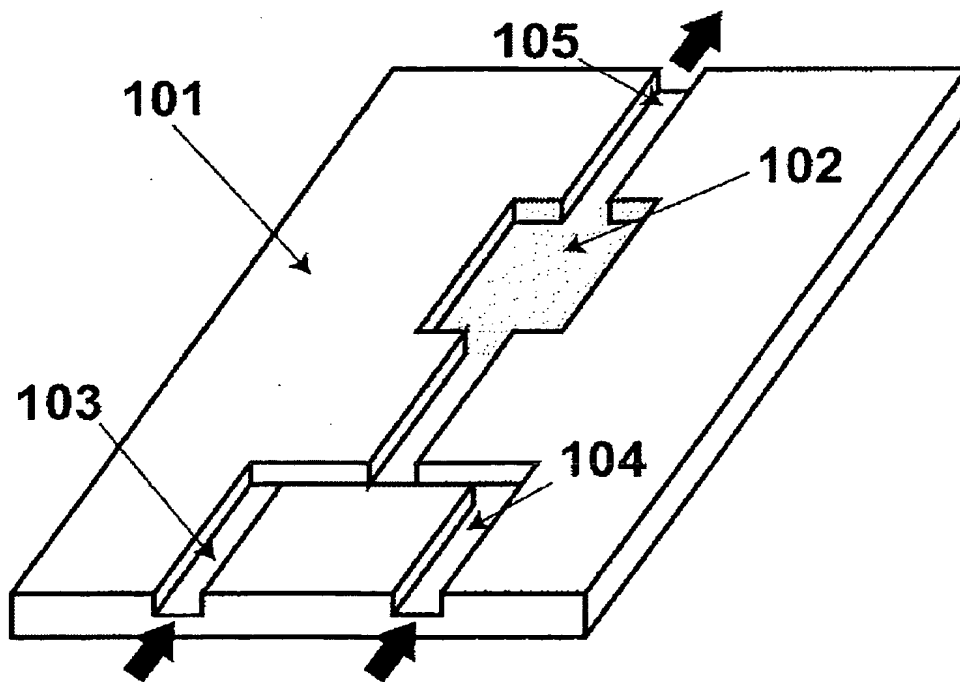
【図8】



【図 9】



【図 10】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 タンパク質や基質等が拡散しやすい構造体が望まれていた。

【解決手段】 そこで、本発明は、枝分かれしたロッド状の形態を有する構成単位から形成される多孔質材料であって、前記ロッドの短軸方向に配向したチューブ状のメソ孔と、枝分かれしたロッド状構成単位が三次元的に網目状に配列することで、ロッド間に形成されるマクロ細孔とを併せ持つ多孔質材料を提供するものである。

【選択図】 図 1



特願 2 0 0 5 - 1 6 6 7 5 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 1 0 0 7 ]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 3 0 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号
氏 名	キヤノン株式会社